定点突变改善 *Pv*EH1 对邻甲基苯基缩水甘油醚的催化特性*

阚婷婷[1] 宗迅成[2] 苏永君[1] 王婷婷[1] 李 闯[2] 胡 蝶[3**] 邬敏辰[3**]

(1 江南大学药学院 无锡 214122 2 江南大学生物工程学院 无锡 214122 3 江南大学无锡医学院 无锡 214122)

摘要 环氧化物水解酶能够对外消旋环氧化物进行动力学拆分保留单构型的环氧化物。测定了菜豆环氧化物水解酶 (*Pv*EH1) 针对苯基缩水甘油醚及其甲基衍生物的催化特性，并基于分子对接及多序列比对分析确定 7 个突变位点，通过单点和组合突变对 *Pv*EH1 进行改造，以期改善 *Pv*EH1 对邻甲基苯基缩水甘油醚 (**1a**) 的催化特性。底物谱分析表明 *Pv*EH1 对 **1a** 的催化活性 (157.2 U/g 湿细胞) 和对映选择性 (E = 5.6) 最高。单点突变结果显示 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I}}$ 和 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{V106I}}$ 对 **1a** 的催化活性和对映选择性均有明显提高；L105I 和 V106I 位组合突变菌株 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I/V106I}}$ 的催化活性 (493.8 U/g 湿细胞) 是 *E. coli*/*pveh1* 的 3.1 倍，对映选择性 (E = 8.3) 也提高至 *E. coli*/*pveh1* 的 1.5 倍。纯化后 *Pv*EH1$^{\mathrm{L105I/V106I}}$ 的催化活性为 17.6 U/mg 是 *Pv*EH1 的 1.5 倍，对 **1a** 的催化效率提高至 *Pv*EH1 的 2.1 倍。SDS-PAGE 分析表明提高了蛋白的可溶性表达量。利用 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I/V106I}}$ 全细胞催化 100 mmol/L **1a** 水解动力学拆分获得手性纯 (*R*)-**1a** (*ee* > 96%) 的产率和时空产率分别为 31.2%和 5.12 g/L/h，因此，在手性纯 (*R*)-**1a** 的制备中，*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I/V106I}}$ 是一种颇具潜力的生物催化剂。

关键词 环氧化物水解酶 定点突变 催化活性 动力学拆分 邻甲基苯基缩水甘油醚

中图分类号 Q814.9

环氧化物水解酶 (epoxide hydrolases，EHs，EC 3.3.2.-) 广泛存在于植物、动物及微生物中，其可以立体选择性地催化环氧化物的三元环开环生成邻二醇，或保留单构型环氧化物[1]。绝大多数 EHs 属于α/β折叠型水解酶超家族，典型的α/β型 EHs 由核心结构域 (core domain) 和盖子结构域 (lid domain) 组成。核心结构域一般由 5 个α-螺旋和 8 个β-折叠股组成[2]，含有催化三联体 (catalytic triad) Asp-His-Asp。α/β核心结构域的上方具有一个由 5 个α-螺旋组成的盖子结构域，位于该域的两个高度保守的质子供体 Tyr 与催化三联体共同组成活性中心[3]。根据 EHs 对不同底物的立体选择性，环氧化物的水解方式分为两种：动力学拆分和对映归一性水解[4]。

单构型环氧化物是合成手性化合物的重要砌块，在医药、农药、香料和精细化工等领域有着较高的应用价值。例如，(*S*)-环氧苯乙烷是合成抗 HIV 病毒药、杀虫剂等的重要中间体[5]，(*R*)-邻甲基苯基缩水甘油醚是合成β_1-肾上腺素受体拮抗剂的重要原材料[6]。传统化学合成法制备单构型环氧化物常常需要用到重金属元素等有毒物质，不仅面临着巨大的环境和资源的压力，且很难得到高光学纯度的环氧化物。EHs 作为生物催化剂，因具有高对映选择性、反应条件温和和环境友好等优点，符合绿色化学的可持续发展的要求，而受到广大研究者的重视。目前，采用蛋白质/基因工程技术对 EHs 进行“挖掘”

*基金项目：江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (JSCX17_0503)；国家自然科学基金项目 (21676117)。

**通讯作者：电子邮箱：Butterflystudy@163.com；biowmc@126.com。

及对现有的 EHs 进行改造，以获取催化活性高且对映选择性好的 EHs，已成为研究热点。最近，Li 等[7]从菜豆中挖掘出一种新型环氧化物水解酶 *Pv*EH2，其对外消旋环氧苯乙烷具有很高的对映选择性。Kong 等[8]基于 *Bm*EH 的晶体结构定点突变得到的两株突变体 F128A 和 M145A 对萘基缩水甘油醚的催化活性分别提高了 42 和 25 倍。

本研究室前期从菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 总 RNA 中扩增出编码菜豆环氧化物水解酶的基因 *pveh1* (Genebank: KR604729)，并实现其在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中的异源表达[9]。本研究首先测定了 *Pv*EH1 对外消旋苯基缩水甘油醚及其甲基衍生物的催化活性和对映选择性，并通过同源建模构建了 *Pv*EH1 的蛋白质三维结构，通过单点及组合突变对其进行分子改造，改善其催化特性，为其他 EHs 的改造提供了新的实施案例与宝贵经验。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、质粒和培养基　*E. coli* BL21(DE3) 及携带有表达质粒 pET-28a-*pveh1* 的重组菌株 *E. coli*/*pveh1* 由本实验室保藏；LB 培养基：胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L 和 NaCl 10 g/L，自然 pH。

1.1.2　工具酶和试剂　DNA 聚合酶 PrimeSTAR HS 和限制性内切酶 *Dpn* I 购自 TaKaRa 公司；蛋白质 Marker 和 DNA Marker 购自上海 Sangon 公司；外消旋邻甲基苯基缩水甘油醚 (**1a**)、外消旋间甲基苯基缩水甘油醚 (**2a**)、外消旋对甲基苯基缩水甘油醚 (**3a**) 由本实验室合成；外消旋苯基缩水甘油醚 (**4a**) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。手性正相 HPLC 色谱柱 Chiralcel® OD-H (5 μm，4.6 mm × 250 mm) 购自于大赛璐药物手性技术 (上海) 有限公司。

1.2　*Pv*EH1 的底物谱测定

1.2.1　*E. coli*/*pveh1* 的诱导表达　挑取工程菌 *E. coli*/*pveh1* 的单菌落接种到 2 mL 含 100 μg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中，37 ℃、220 rpm 培养 12 h 后，以 2% (v/v) 的量转接至 100 mL 相同的培养基中，培养至 OD_{600} 为 0.6~0.8 时，添加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L，20 ℃、220 rpm 诱导培养 10 h，收集菌体[9]。利用 K_2HPO_4-KH_2PO_4 缓冲液 (KPB，100 mmol/L，pH 7.0) 重新悬浮湿菌体，配制成 10 mg/mL 的菌悬液，用于后续催化性质测定。

1.2.2　HPLC 分析条件　样品分析采用高效液相色谱 Waters e2695 HPLC 系统、正相 Chiralcel® OD-H 色谱柱和紫外检测器 Waters 2489，检测波长 220 nm，色谱柱温 30 ℃，流动相是正己烷:异丙醇 (9:1 或 8:2, v/v)，流速 0.8 mL/min，进样量 10 μL。分析条件如表 1 所示。

表 1　分析条件

Table 1 Analysis conditions

Epoxides/ diols [1]	Mobile phase	Molar extinction coefficients (ε)	Retention time (min)	
			(*R*)-/(*S*)-epoxide	(*R*)-/(*S*)-diol
1a/1b	8:2	0.9653	6.521/8.019	8.914/9.873
2a/2b	8:2	0.8871	6.845/10.059	8.423/16.341
3a/3b	9:1	1.1638	7.368/8.701	15.130/21.799
4a/4b	8:2	0.9381	7.511/10.791	8.951/15.675

[1] **1b**~**4b** represent the corresponding vicinal diols of **1a**~**4a**.

1.2.3 *Pv*EH1对苯基缩水甘油醚及其甲基衍生物的催化性质测定 在2 mL EP管中加入850 μL KPB和100 μL适当稀释的菌悬液，25 ℃保温10 min，再加入50 μL的甲醇溶解的**1a**至终浓度为10 mmol/L进行反应。定时取样100 μL至1 mL乙酸乙酯中萃取，上层有机相经无水$MgSO_4$干燥和0.22 μm有机膜过滤，按1.2.2方法进行HPLC样品分析。此外，**2a**、**3a**和**4a**测定方法同上。*Pv*EH1的酶活力单位 (U) 定义为：在25 ℃反应条件下，每分钟催化1 μmol底物转化成产物所需的酶量。*E*值计算公式参考文献[9]。

1.3 突变位点的选择

根据底物谱测定结果，*Pv*EH1对**1a**表现出最高的催化活性及对映选择性，因此以**1a**作为模式底物。以单点和组合突变的方法提高*Pv*EH1的催化活性和对映选择性。

选择与*Pv*EH1一级结构同源性高 (87.38%) 且晶体结构已知的*Vr*EH1晶体结构 (PDB：5XMD) 为模板，运用SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/) 对*Pv*EH1的三维结构进行建模，并使用SAVES网站 (http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/) 的在线工具Procheck及Verify_3D对建模结果进行评估，验证其可靠性。使用ChemDraw Ultra 12.0 (http://www.cambridgesoft.com/) 构建 (*S*)-**1a**的三维结构并进行能量最小化。以*Pv*EH1的三维结构为受体，运用AutoDock 4.2程序 (http://autodock.scripps.edu/)，将底物 (*S*)-**1a**对接至活性中心的合适位置，并用GROMACS 4.5程序包 (http://www.gromacs.org/) 进行优化。运用PyMol软件 (http://pymol.org/) 软件确定距离底物6 Å以内的氨基酸残基，结合*Pv*EH1与其他三种植物来源的EHs：*Pv*EH3[10] (ATG22745)、*Vr*EH3[11] (AKJ75505)、*St*EH[12] (AAA81892) 的一级序列比对结果，选择其中的7个氨基酸作为拟突变位点，将其分别突变为相对应的高频氨基酸。

1.4 引物设计

基于*Pv*EH1的一级结构和三维结构的分析，拟将*pveh1*中编码L105的密码子CTA突变为I的ATT，V106的密码子GTA突变为I的ATC，M129的密码子ATG突变为L的CTG，P137的密码子CCC突变为T的ACA，M175的密码子ATG突变为I的ATT，L237的密码子CTC突变为M的ATG，I265的密码子ATA突变为M的ATG，根据*pveh1*的核苷酸序列设计PCR引物，委托苏州金唯智生物科技有限公司合成，引物名称和序列如表2所示。

表 2　突变引物序列

Table 2　Sequences of primers for mutagenesis

Primer name	Primer sequence (5′→3′)
L105I-F	CCATGATTGGGGAGCGATTGTAGGATGGTAC
V106I-F	ATGATTGGGGAGCACTAATCGGATGGTACACA
M129L-F	CTCAGCGTCCCTTTCCTGCCCAGAAACCCA
P137T-F	CTAAGGTGAAGACAGTTGATGCCATGCG
M175I-F	GAAGCAATCAAGAACATTCTGACAAGTAGGAGACC
L237M-F	CTATAGAAATATGAACCTGAACTGGGAGC
I265M-F	TACAGGCGATTTGGATATGGTTCACAC
L105I/V106I-F	ATGATTGGGGAGCAATAATCGGATGGTACACA
T7-terminator primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Note: The codons encoding mutation residues are boxed.

1.5　单点及组合突变酶的基因构建及表达

以 pET-28a-*pveh1* 为模板，L105I-F、V106I-F 等为上游引物，T7-terminator primer 为下游引物，利用 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶进行全质粒 PCR 扩增，构建突变体质粒。其中 PCR 条件如下：一轮 PCR：预变性 95 ℃，4 min；变性 98 ℃，10 s；退火 55 ℃，5 s；延伸 72 ℃，1 min；从变性到延伸循环 30 次，最后充分延伸 72 ℃，10 min。二轮 PCR 以一轮 PCR 产物为引物，条件为：预变性 95 ℃，4 min；变性 98 ℃，10 s；退火 55 ℃，15 s；延伸 72 ℃，6 min；从变性到延伸循环 30 次，最后充分延伸 72 ℃，10 min。将 PCR 产物经限制性内切酶 *Dpn* I 消化后转化至 *E. coli* BL21 (DE3)，培养 12 h 后对转化子进行菌液 PCR 验证，并对阳性转化子进行测序，将测序结果正确的质粒命名为 pET-28a-*pveh1* ^{突变位点} (突变位点分别为 L105I、V106I、M129L、P137T、M175I、L237M、I265M、L105I/V106I)，其对应的突变工程菌命名为 *E. coli*/*pveh1* ^{突变位点}。突变工程菌诱导表达方法参照 1.2.1。

1.6　*Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$的蛋白纯化

将工程菌 *E. coli*/*pveh1* 及 *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 诱导表达，收集的菌体用破碎缓冲液(含 Tris-HCl 20 mmol/L，NaCl 500 mmol/L，pH 7.5) 重悬成 50 mg/mL 的浓度，菌悬液经超声破碎后，4 ℃、11000 rpm 离心 15 min。上清即为粗酶液，用 0.45 μm 水膜过滤后，采用 Ni-NTA 柱纯化蛋白。SDS-PAGE 分析表达产物。蛋白含量测定方法参照文献[13]。

1.7　*Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$的动力学常数的测定

以不同浓度[*S*] (1.0~10.0 mmol/L) 的 **1a** 作为底物，在 25 ℃和 pH 7.0 条件下反应，按照 1.2.3 所述的方法测定纯化蛋白的初始反应速率[*V*]，采用 Lineweaver-Burk 双倒数作图法，分别以底物浓度倒数 1/[*S*]和初始反应速率倒数 1/[*V*]为横、纵坐标，Origin 9.0 软件进行非线性拟合，计算酶的动力学常数 k_{cat} 和 K_m 以及催化效率 k_{cat}/K_m。

1.8 *E. coli/pveh1*^L105I/V106I^ 全细胞水解动力学拆分外消旋邻甲基苯基缩水甘油醚

为了确定 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 全细胞水解动力学拆分 **1a** 的最大浓度，以对映体过量（enantiomeric excess，*ee*）为指标，在 2 mL EP 管中分别加入 **1a** 浓度 50~120 mmol/L，并分别加入 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 全细胞至终浓度 15 mg/mL，反应体系 1 mL，25 ℃反应 3 h。参照 1.2.3 进行样品处理及 HPLC 测定 *ee*、转化率（conversion ratio，*c*）和产率（yield, *Y*）。计算公式参照文献[14]。

在确定最大反应浓度后，放大反应体系至 10 mL，含有 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 全细胞 0.15 g 和 **1a** 原液 0.1642 g，25 ℃反应。反应定时进行取样，并参照 1.2.3 进行样品处理及 HPLC 测定的残余（*R*)-**1a** 及（*S*)-**1a** 的浓度、*ee* 和 *c* 绘制反应进程曲线。并计算时空产率（space-time yield, STY)。STY 表示在一定的反应条件下，单位体积单位时间内获得目的产物总量，单位 g/L/h。

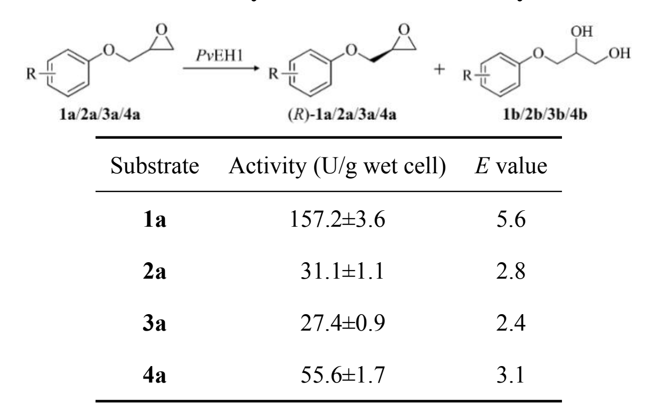
2 结果讨论

2.1 *Pv*EH1 的底物谱测定

*Pv*EH1 对苯基缩水甘油醚及其甲基衍生物的催化特性如表 3 所示，其中，*Pv*EH1 对 **1a** 的催化活性和对映选择性均高于其他底物，故选择 **1a** 作为模式底物。针对这四种环氧化物的对映选择性，*Pv*EH1 均优先水解（*S*)-构型底物，保留（*R*)-构型底物，与来源微变冢村氏菌（*Tsukamurella paurometabola*）的 *Tp*EH 类似[15]。

表 3 *Pv*EH1 的催化活性及对映选择性

Table 3 The activity and enantioselectivity of *Pv*EH1



Substrate	Activity (U/g wet cell)	*E* value
1a	157.2±3.6	5.6
2a	31.1±1.1	2.8
3a	27.4±0.9	2.4
4a	55.6±1.7	3.1

2.2 突变位点的选择

运用 AutoDock 4.2 程序对 *Pv*EH1 和（*S*)-**1a** 进行分子对接模拟，其结果如图 1 所示。对接结果显示，距离底物 6 Å以内的氨基酸残基共计有 30 个，通过与其他三种植物来源的 EHs 的一级序列比对，除去包括催化三联体和两个质子供体在内的 19 个保守位点，4 个为相对保守位点（将 *Pv*EH1 的氨基酸与其他 3 种 EHs 同一位点中的 2 个氨基酸相同的定义为相对保守氨基酸)，选择剩下的 7 个非保守氨基酸作为拟突变位点 L105、V106、M129、P137、M175、L237 和 I265，并将其分别突变为在其他 EHs 中出现频率高的氨基酸 I、I、L、T、I、M 和 M。

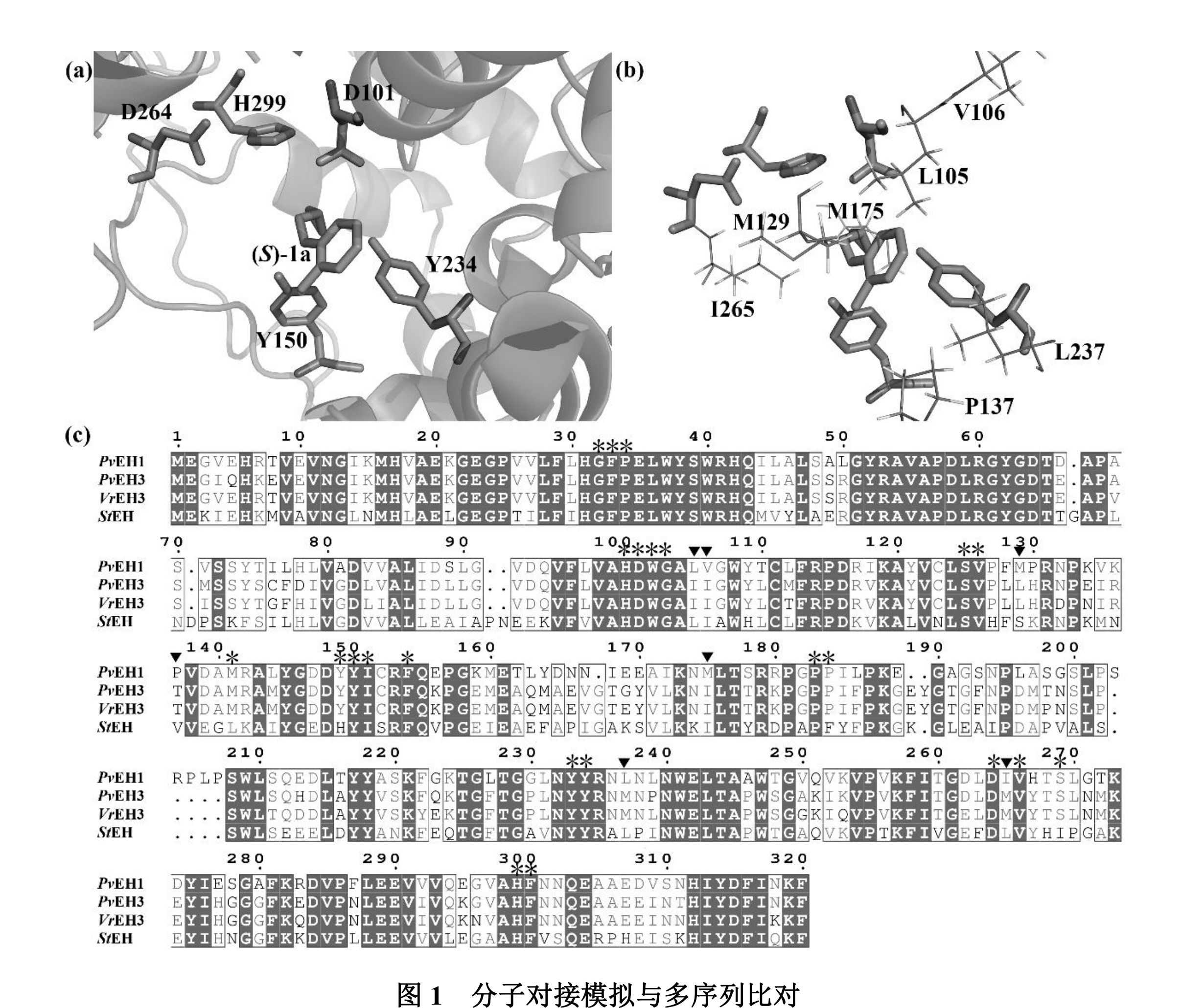


图 1　分子对接模拟与多序列比对

Fig. 1　Molecular docking simulation and multiple sequence alignment

(a) The locally magnified 3-D configuration of *Pv*EH1 docking with (*S*)-**1a**; (b) Spatial locations of mutation sites; (c) Multiple sequence alignment of *Pv*EH1 with three plant-derived EHs. Thirty residues of *Pv*EH1 in proximity to (*S*)-**1a** within 6 Å are marked, among which seven ones selected for site-directed mutagenesis are highlighted in triangles.

2.3　*Pv*EH1 突变体的催化特性分析

以全细胞为生物催化剂，按 1.2.3 方法测定各突变体对 **1a** 的催化特性。如表 4 所示，与 *E. coli*/*pveh1* 相比，*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{P137T}}$ 的催化活性和 *E* 值均明显下降，*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L237M}}$ 和 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{I265M}}$ *E* 值分别提高了 12.5%和 7.1%，催化活性却有不同程度的下降。*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{M129L}}$ 和 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{M175I}}$ 的催化活性和 *E* 值无明显变化。*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I}}$ 和 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{V106I}}$ 的催化活性和 *E* 值均提高 20%以上，表明 L105I 和 V106I 对催化特性提高有积极作用，所以将这两个突变位点进行组合突变，以期望得到更好的效果。且有文献报道，空间位置相近且对催化特性有积极意义的氨基酸位点同时突变可能会产生协同作用，进一步增强 EHs 的催化特性[16]。按 1.5 方法构建突变菌株 *E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I/V106I}}$，其催化特性测定结果显示，*E. coli*/*pveh1*$^{\mathrm{L105I/V106I}}$ 全细胞催化活性提高到 493.8 U/g 湿细胞，是 *E. coli*/*pveh1* 的 3.1 倍；*E* 值提高到 8.3，是 *E. coli*/*pveh1* 的 1.5 倍。Reetz 等[17]对 *An*EH 采用易错 PCR 的方法，从 20 000 个转化子中筛选出一株最好的突变株 IS002B1，其对

苯基缩水甘油醚的 *E* 值从 4.6 提高至 10.8。Zou 等[18]对来源于放射形土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter* AD1) 的 *Ar*EH 活性中心周围的氨基酸进行定点突变，得到的单点突变体 T247K、I108L 对环氧氯丙烷的 *E* 值和催化活性均有提高，双位点组合后，突变体 T247K/I108L 的 *E* 值和催化活性分别提高了 44%和 345%。以上研究表明，在获得有效果的单点突变体的基础上进行组合突变，能够较为显著地提高酶对于特定底物的催化性质，由此可见，该方法是一种行之有效的提高酶的催化特性的方法。

表 4　突变体的催化特性

Table 4　Catalytic properties of mutants towards 1a

Enzyme	Activity (U/g wet cell)	Relative activity (%)	*E* value
*Pv*EH1	157.2±3.6	100	5.6
*Pv*EH1^{L105I}	320.4±8.6	203.8	6.8
*Pv*EH1^{V106I}	234.8±5.9	149.4	7.0
*Pv*EH1^{M129L}	153.2±4.6	97.5	5.7
*Pv*EH1^{P137T}	10.4±0.5	6.6	2.5
*Pv*EH1^{M175I}	170.3±4.3	108.3	5.3
*Pv*EH1^{L237M}	122.8±3.4	78.1	6.3
*Pv*EH1^{I265M}	74.6±1.8	47.5	6.0
*Pv*EH1$^{L105I/V106I}$	493.8±9.8	314.1	8.3

2.4　*Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 的表达及纯化

E. coli/*pveh1* 及 *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 经诱导表达和超声破碎后，上清液采用 Ni-NTA 柱纯化目的蛋白。SDS-PAGE 分析显示 (图 2)，*E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 比 *E. coli*/*pveh1* 的粗酶液目的蛋白表达量明显提高，纯化后的 *Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 均在约 35.7 kDa 处呈现单一蛋白条带。纯化后 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 的催化活性为 17.6 U/mg，是原酶 *Pv*EH1 (11.7 U/mg) 的 1.5 倍，与全细胞为催化剂 (3.1 倍) 时相比提高倍数降低，结合 SDS-PAGE 电泳图分析可知 L105 和 V106 位的组合突变提高了可溶性蛋白的表达量。Li 等[19]也报道了通过定点突变，在提高了催化活性的同时，也提高了 *Pv*EH3$^{G170E/F187L/P237L}$ 在 *E. coli* BL21 中的表达量。

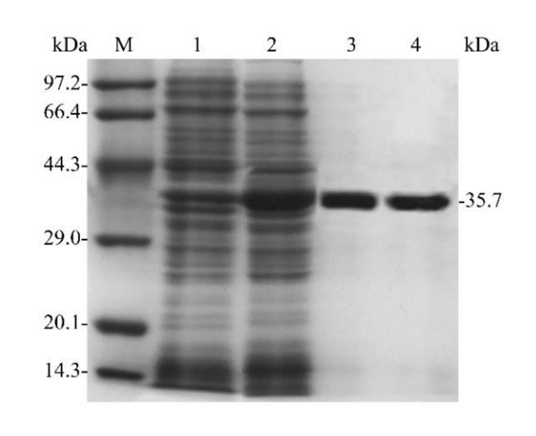


图 2　*Pv*EH1 和 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ SDS-PAGE 分析

Fig. 2　SDS-PAGE analysis of the purified *Pv*EH1 and *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$

Lane M: Protein Marker; lane 1: Supernatant extract of *E. coli*/*pveh1*; lane 2: Supernatant extract of *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$; lane 3: Purified *Pv*EH1; lane 4: Purified *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$

2.5　*Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 的动力学常数分析

按 1.7 方法，测定了 *Pv*EH1 及 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 的动力学常数 k_{cat} 和 K_m（表 5)。分析结果表明，与 *Pv*EH1 相比，组合突变体 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 催化 **1a** 水解动力学拆分的动力学常数发生了变化。*Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 催化常数 k_{cat} 从 7.4 提高至 10.7，K_m 值从 0.9 降低至 0.6 mmol/L，从而催化效率（k_{cat}/K_m）提高至 *Pv*EH1 的 2.1 倍。结果表明 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 催化效率提高的主要原因是提高了酶的催化常数和酶对底物的亲和力。

表 5　*Pv*EH1 和 *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 的动力学常数

Table 5　The kinetic parameters of *Pv*EH1 and *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$

Enzyme	k_{cat} (1/s)	K_m (mmol/L)	k_{cat}/K_m (L/mmol/s)
*Pv*EH1	7.4	0.9	8.3
*Pv*EH1$^{L105I/V106I}$	10.7	0.6	17.7

2.6　*E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 水解动力学拆分外消旋邻甲基苯基缩水甘油醚

为了更好地将 *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 应用于工业生产，本研究确定其水解动力学拆分 **1a** 的最大浓度，使用 *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 水解动力学拆分 50、80、100 和 120 mmol/L **1a**。结果如表 6 所示，*E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 最高可以水解 100 mmol/L **1a**，得到（*R*)-**1a** 的产率为 19.9%，ee > 99%。当 **1a** 浓度达到 120 mmol/L 时，即使反应时间延长至 6 h，*ee* 仍然仅为 80.3%。因此，确定水解 **1a** 的最大浓度为 100 mmol/L。

表 6　*E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 水解动力学拆分高浓度 1a

Table 6　Kinetic resolution of 1a at high concentrations using *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$

1a (mmol/L)	Time (h)	*c* (%)	ee_s (%)	Yield (%)
50	3	90.2	> 99	9.8
80	3	86.1	> 99	13.8
100	3	80.0	> 99	19.9
120	3	74.8	80.4	22.7

以 15 mg/mL *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ 在 10 mL 体系中水解动力学拆分 100 mmol/L **1a**。其水解反应进程如图 3 所示。在反应 60 min 后，(*S*)-**1a** 仅剩余 0.6 mmol/L，得到（*R*)-**1a** 的产率为 31.2% (*ee* > 96%)，高于 *An*EH[20]的 29%，但低于 *Tl*EH[21]的 40%，STY 为 5.12 g/L/h，分别是 *An*EH 和 *Tl*EH 的 21 和 10 倍。本研究为生物酶法水解动力学拆分 **1a** 工业化生产手性纯（*R*)-**1a**，提供了一种可替代化学法制备（*R*)-**1a** 的新选择。

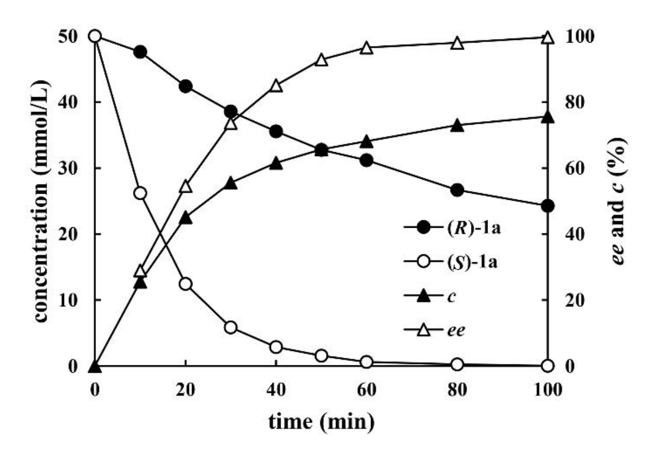


图 3 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 催化 1a 的水解进程曲线

Fig. 3 Hydrolysis progress curves of 1a by *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$

3 结论

本研究以 *Pv*EH1 为研究对象，其具有广阔的底物谱，能对苯基缩水甘油醚及其甲基衍生物进行动力学拆分，基于理性设计的定点突变有效的提高了该酶对邻甲基苯基缩水甘油醚（**1a**）的催化活性和对映选择性。本研究采用了基于理性设计的定点突变对 *Pv*EH1 进行分子改造。*Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ 不仅提高了其对 **1a** 的对映选择性，而且提高了其在 *E. coli* BL21 中可溶性蛋白的表达量，提高其对 **1a** 的底物亲和力，从而明显提高突变菌株 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 的催化活性。利用 *E. coli/pveh1*$^{L105I/V106I}$ 全细胞催化 100 mmol/L **1a** 水解动力学拆分获得手性纯（*R*)-**1a** 的 *ee* > 96%，产率为 31.2%，STY 为 5.12 g/L/h，为工业化生产手性纯（*R*)-**1a** 提供了一种合理的方案。

参考文献

[1] Woo J H, Kang K M, Kwon T H, et al. Isolation, identification and characterization of marine bacteria exhibiting complementary enantioselective epoxide hydrolase activity for preparing chiral chlorinated styrene oxide derivatives. J Ind Eng Chem, 2015, 28: 225–228.

[2] Wohlgemuth R, Archelas A, Kotik M. Epoxide hydrolases and their application in organic synthesis. Curr Org Chem, 2012, 16(4): 451–482.

[3] Mateo C, Solares L F. Improvement of the epoxide hydrolase properties for the enantioselective hydrolysis of epoxides. Curr Org Chem, 2013, 17(7): 744–755.

[4] Bala N, Chimni S S. Recent developments in the asymmetric hydrolytic ring opening of epoxides catalysed by microbial epoxide hydrolase. Tetrahedron: *Asymmetry*, 2010, 21(24): 2879–2898.

[5] Wu S, Li A, Chin Y S, et al. Enantioselective hydrolysis of racemic and *meso*-epoxides with recombinant *Escherichia coli* expressing epoxide hydrolase from *Sphingomonas* sp. HXN-200: preparation of epoxides and vicinal diols in high *ee* and high concentration. ACS Catal, 2013, 3(4): 752–759.

[6] Bisi A, Rampa A, Budriesi R, et al. Cardiovascular hybrid drugs: new benzazepinone derivatives as bradycardic agents endowed with selective β_1-Non-competitive antagonism. Bioorg Med Chem, 2003,

11(7): 1353–1361.

[7] Li C, Hu D, Zong X C, et al. Asymmetric hydrolysis of styrene oxide by *Pv*EH2, a novel *Phaseolus vulgaris*, epoxide hydrolase with extremely high enantioselectivity and regioselectivity. Catal Commun, 2017, 102: 57–61.

[8] Kong X D, Yuan S, Li L, et al. Engineering of an epoxide hydrolase for efficient bioresolution of bulky pharmaco substrates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Proc Nat Acad Sci, 2014, 111(44): 15717–15722.

[9] 叶慧华，胡蝶，李闯，等. 新型菜豆环氧化物水解酶的异源表达及对映归一性催化特性. 中国生物工程杂志, 2016, 36(10): 21–27.

Ye H H, Hu D, Li C, et al. Expression of a novel epoxide hydrolase from *Phaseolus vulgaris* and its enantioconvergent catalytic performance. China Biotechnology, 2016, 36(10): 21–27.

[10] 王瑞，许耀辉，王克伟，等. 环氧化物水解酶 *Pv*EH3 的表达及手性邻二醇的合成. 化工进展, 2018, 37(5): 1933–1939.

Wang R, Xu Y H, Wang K W, et al. Expression of *Pv*EH3, a *Phaseolus vulgaris* epoxide hydrolase, and synthesis of chiral vicinal diols. Chemical Industry Engineering Progress, 2018, 37(5): 1933–1939.

[11] Hu D, Tang C D, Li C, et al. Stereoselective hydrolysis of epoxides by re*Vr*EH3, a novel *Vigna radiata* epoxide hydrolase with high enantioselectivity or high and complementary regioselectivity. Journal of Agricultural and Food Chemistry J Agric Food Chem, 2017, 65(45): 9861–9870.

[12] Mowbray S L, Elfström L T, Ahlgren K M, et al. X-ray structure of potato epoxide hydrolase sheds light on substrate specificity in plant enzymes. Protein Sci, 2006, 15(7): 1628–1637.

[13] 舒群峰，徐美娟，李静，等. 钝齿棒杆菌中异源表达 *N*-乙酰鸟氨酸脱乙酰基酶合成 L-鸟氨酸的研究. 中国生物工程杂志, 2018, 38(7): 29–39.

Shu Q F, Xu M J, Li J, et al. Producing L-ornithine by heterologous expression of *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase in *Corynebacterium crenatum*. China Biotechnology, 2018, 38(7): 29–39.

[14] 石小玲，阚婷婷，李闯，等. 菜豆环氧化物水解酶的表达及其催化特性研究. 微生物学通报, 2018, 45(4): 797–804.

Shi X L, Kan T T, Li C, et al. Expression and characterization of *Phaseolus vulgaris* epoxide hydrolase. Microbiology China, 2018, 45(4): 797–804.

[15] Wu K, Wang H, Sun H, et al. Efficient kinetic resolution of phenyl glycidyl ether by a novel epoxide hydrolase from *Tsukamurella paurometabola*. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(22): 9511–9521.

[16] Reetz M T, Bocola M, Wang L W, et al. Directed evolution of an enantioselective epoxide hydrolase: uncovering the source of enantioselectivity at each evolutionary stage. J Am Chem Soc, 2009, 131(21): 7334–7343.

[17] Reetz M T, Torre C, Eipper A, et al. Enhancing the enantioselectivity of an epoxide hydrolase by

directed evolution. Org Lett, 2004, 6(2): 177–180.

[18] Zou S P, Zheng Y G, Wu Q, et al. Enhanced catalytic efficiency and enantioselectivity of epoxide hydrolase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by iterative saturation mutagenesis for (*R*)-epichlorohydrin synthesis. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(2): 733–742.

[19] Li C, Zhao J, Hu D, et al. Multiple site-directed mutagenesis of a *Phaseolus vulgaris* epoxide hydrolase to improve its catalytic performance towards *p*-chlorostyrene oxide based on the computer-aided re-design. Int J Biol Macromol, 2019, 121: 326–332.

[20] Choi W J, Huh E C, Park H J, et al. Kinetic resolution for optically active epoxides by microbial enantioselective hydrolysis. Biotechnol Tech, 1998, 12(3): 225–228.

[21] Xu Y, Xu J H, Pan J, et al. Biocatalytic resolution of glycidyl aryl ethers by *Trichosporon loubierii*: cell/substrate ratio influences the optical purity of (*R*)-epoxides. Biotechnol Lett, 2004, 26(15): 1217–1221.

Site-directed Mutagenesis of *Pv*EH1 to Improve Its Catalytic Properties towards *ortho*-Methylphenyl Glycidyl Ether

KAN Ting-ting[1] ZONG Xun-cheng[2] SU Yong-jun[1] WANG Ting-ting[1] LI Chuang[2] HU Die[3] WU Min-chen[3]

(1 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(2 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

(3 Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract Epoxide hydrolases can catalyze the kinetic resolution of racemic epoxides, retaining enantiopure single enantiomers of epoxides. In this study, the catalytic properties of *Phaseolus vulgaris* epoxide hydrolase (*Pv*EH1) towards phenyl glycidyl ether and its methyl derivates were assayed. Seven residues of *Pv*EH1 were then selected for site-directed mutagenesis based on the results of molecular docking simulation and multiple sequence alignment, followed by single-site and combinatorial mutagenesis to obtain mutants possessing enhanced catalytic properties towards *ortho*-methylphenyl glycidyl ether (**1a**). The substrate spectrum analysis showed that *Pv*EH1 displayed both the highest activity (157.2 U/g wet cell) and enantioselectivity (E = 5.6) towards **1a**. Thus, **1a** was selected as the model substrate. Among the constructed seven *E. coli* transformants expressing single-site mutant of *Pv*EH1, *E. coli*/*pveh1*^{L105I} and *E. coli*/*pveh1*^{V106I} exhibited notably improved EH activity and E value. Compared with *E. coli*/*pveh1*, the EH activity and E value of *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ were improved by 2.1 times and 50%, respectively. Additionally, the specific activity (17.6 U/mg) and the catalytic efficiency (17.7 L/mmol/s) of purified *Pv*EH1$^{L105I/V106I}$ were 1.5- and 2.1-fold those of *Pv*EH1. SDS-PAGE analysis indicated that the soluble expression level of target protein was enhanced by the combinatorial mutagenesis. The kinetic

resolution of 100 mmol/L **1a** by *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ whole cells afforded (*R*)-**1a** (*ee* > 96%) with 31.2% yield and a space-time yield of 5.12 g/L/h. Therefore, the superior enzymatic properties will make *E. coli*/*pveh1*$^{L105I/V106I}$ a promising biocatalyst for the preparation of optically pure (*R*)-**1a**.

Keywords Epoxide hydrolase Site-directed mutagenesis Catalytic activity Kinetic resolution *ortho*-Methylphenyl glycidyl ether